

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**“PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS
HISTÓRICOS E CONTEMPORÂNEOS DE *Pasteurella multocida* DE SUÍNOS”**

AMANDA FIGUEIREDO AMARAL

PORTO ALEGRE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

“PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS
HISTÓRICOS E CONTEMPORÂNEOS DE *Pasteurella multocida* DE SUÍNOS”

Autor: Amanda Figueiredo Amaral

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na
área de Sanidade Suína

Orientador: Prof. David Emilio S. N. de Barcellos

PORTO ALEGRE

2016

Amanda Figueiredo Amaral

**“PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS
HISTÓRICOS E CONTEMPORÂNEOS DE *Pasteurella multocida* DE SUÍNOS”**

Aprovada em 18 de março de 2016.

APROVADA POR:

Dr. David Emilio S. N. de Barcellos

Orientador e Presidente da Comissão

Dr. Eraldo Lourenso Zanella

Membro da Comissão

Dra. Marisa da Costa

Membro da Comissão

Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. David Barcellos pela confiança, conhecimentos compartilhados, conselhos profissionais e pessoais, e bom exemplo de professor.

Aos professores Fernando Bortolozzo, Ivo Wentz e Mari Bernardi pelos ensinamentos, disponibilidade e bons exemplos de profissionais. A toda equipe do Setor de Suínos (estagiários, pós-graduandos e funcionários), em especial às meninas da Sanidade Karine Takeuti, Ligiani Mion e Luciane Jühlich, pelos conhecimentos compartilhados e boas risadas. Karine Takeuti, obrigada pela ajuda na elaboração dessa dissertação.

À professora Marisa Cardoso pelos conhecimentos compartilhados, disponibilidade e paciência para esclarecer minhas inúmeras dúvidas. A João Xavier por me ceder suas amostras e pela disponibilidade em ajudar. A Cintia Simoni, Daniel Paim, Vanessa Laviniki, Graciela Lopes (Preventiva) e Mariana Andrade pelos ensinamentos e por esclarecer minhas dúvidas.

A toda equipe da Embrapa suínos e aves, em especial à pesquisadora Catia Klein, pela parceria e confiança, e ao estatístico Arlei Coldebella pelo auxílio na análise estatística. Agradeço imensamente à analista Raquel Rebelatto pela ajuda fundamental na realização do meu projeto de mestrado.

À CAPES pelo auxílio financeiro e científico. A César Feronato (MSD) e Eliana Dantas (Bayer) pelo auxílio financeiro na compra de antimicrobianos.

Aos membros do PPGCV da UFRGS.

Às minhas colegas de apartamento Fabiane Zanchin, Juliana Bassani e Simone Silveira pelo carinho e bons momentos compartilhados. Ao meu professor de Inglês Felipe Krebs pelos ensinamentos, carinho e boas risadas.

À minha mãe Elisa pelo amor incondicional, por fortalecer minha fé, apoiar minhas decisões e pelo exemplo de coragem e determinação. Ao meu pai Wilson (*in memoriam*) por me guiar e proteger. Aos meus irmãos Juliana e Diogo pelo apoio, paciência e carinho.

Ao meu noivo Jonathan Fitzpatrick pelo amor sem fronteiras, confiança, conselhos, paciência e amizade. Obrigada pelo interesse e apoio no meu mestrado.

RESUMO

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS HISTÓRICOS E CONTEMPORÂNEOS DE *Pasteurella multocida* DE SUÍNOS

Autor: Amanda Figueiredo Amaral

Orientador: Prof. David Emilio S. N. de Barcellos

O primeiro estudo desenvolvido teve como objetivo determinar e comparar o perfil de suscetibilidade de isolados de *P. multocida* de suínos com lesões de pneumonia ou pleurite no Brasil durante dois períodos. A concentração inibitória mínima (CIM) de quatro antimicrobianos foi calculada para os isolados históricos (período de 1981 a 1997; n=44) e contemporâneos (período de 2011 a 2012; n=50) pelo teste de microdiluição em caldo segundo recomendações do CLSI. A menor frequência de isolados resistentes, tanto históricos quanto contemporâneos, foi observada para o florfenicol (0% e 6%, respectivamente), enquanto que a maior frequência foi observada para a tetraciclina (20,5% e 34%, respectivamente). Houve aumento do número de isolados resistentes para todos os antimicrobianos testados, devido, provavelmente, à pressão de seleção pelo uso de antimicrobianos para tratamento e prevenção de infecções por *P. multocida*. Em relação aos perfis de suscetibilidade, os isolados históricos e contemporâneos da *P. multocida* foram estatisticamente diferentes ($p < 0.05$) apenas para amoxicilina e enrofloxacin, que tiveram um aumento na frequência de isolados resistentes de 3,8% e 18%, respectivamente. Um segundo estudo foi desenvolvido com o objetivo de comparar os métodos de tipificação capsular dos sorotipos A e D de isolados de *P. multocida* de suínos utilizando técnicas fenotípicas (hialuronidase e acriflavina) e genotípica (PCR *multiplex*). Foram utilizados 44 isolados liofilizados de *P. multocida* de suínos do Rio Grande do Sul obtidos entre os anos de 1981 e 1997. Pelos testes fenotípicos, dois isolados foram classificados como tipo D (4,55%), 40 isolados como tipo A (90,9%) e dois isolados não foi tipificado (4,55%). No entanto, pelo teste genotípico, 38 isolados foram classificados como tipo A (86,36%) e 6 como tipo D (13,64%). Os resultados mostraram que, em alguns casos, não existe equivalência entre a tipificação fenotípica e genotípica de *P. multocida*, neste estudo diferindo em 4/44 isolados (9,09%). Foi concluído que a tipificação capsular de *P. multocida* pela PCR *multiplex* é mais eficiente e confiável que pelos métodos fenotípicos.

Palavras-chave: sorotipos, microdiluição em caldo, resistência, hialuronidase, acriflavina, PCR.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY PROFILE OF *Pasteurella multocida* FROM HISTORICAL AND RECENT PIG ISOLATES

Author: Amanda Figueiredo Amaral

Advisor: Prof. David Emilio S. N. de Barcellos

*The first study was carried out to determine and to compare antimicrobial susceptibility profile of *P. multocida* isolated from pigs with lesions of pneumonia or pleuritis in Brazil during two time periods. Historical isolates (period of 1981 to 1997; n=44) and recent isolates (period of 2011 to 2012; n=50) were used to assess the MIC of four antimicrobial agents by microbroth dilution following CLSI recommendations. Florfenicol had the lowest level of resistance for both historical and recent isolates (0% and 6%, respectively), while tetracycline had the highest (20.5% and 34%, respectively). Resistance increased in recent isolates for all antimicrobials tested, most likely due to the selective pressure of antimicrobial usage to treat and prevent *P. multocida* infections. Regarding to susceptibility profiles, historical and recent *P. multocida* isolates were statistically different ($p < 0.05$) only for amoxicillin and enrofloxacin, which had an increase in the resistance of 3.8% and 18%, respectively. The second study was performed to compare the capsular identification methods of type A and type D *P. multocida* isolates from pigs using both phenotypic (hyaluronidase and acriflavine tests) and genotypic (multiplex PCR) techniques. A total of 44 lyophilized *P. multocida* isolates, obtained between 1981 and 1997 from pig farms at Rio Grande do Sul State were analyzed. Phenotypic tests showed that two isolates were type D (4.55%), 40 were type A (90.9%) and two (4.55%) were untypable isolates (4.55%), while PCR showed that 38 isolates were type A (86.36%) and six were type D (13.64%). The results show that, in some cases, there is no equivalence between phenotypic and genotypic typification of *P. multocida*, in this study differing in 4/44 isolates (9.09%). We conclude that the capsular identification of *P. multocida* by multiplex PCR is more efficient and reliable compared to the phenotypic methods.*

Key-words: *sorotype, microbroth dilution, resistance, hyaluronidase, acriflavine, PCR.*

LISTA DE TABELAS

Tabelas inseridas no artigo I		Página
Table 1	Percentage distribution (%) according to the MIC (minimum inhibitory concentration) of four antimicrobials for 44 historical (H) and 50 recent (R) <i>Pasteurella multocida</i> isolates.	43
Table 2	MIC (minimum inhibitory concentration) range, MIC 50 and MIC 90 of four antimicrobials for 44 historical (H) and 50 recent (R) <i>Pasteurella multocida</i> isolates.	44
Table 3	Antimicrobial resistance profile of four antimicrobials for 44 historical (H) and 50 recent (R) <i>Pasteurella multocida</i> isolates based on CLSI standards (CLSI, 2013b).	44
Tabelas inseridas no artigo II		Página
Table 1	Capsule genes selected, primer sequence and amplicon size.	55
Table 2	Correlation of capsular typing results between phenotypic (hyaluronidase and acriflavine) and genotypic (multiplex PCR) tests.	56

LISTA DE FIGURAS

Figuras inseridas na revisão bibliográfica	Página
Figura 1 Teste de hialuronidase. Colônias de <i>Pasteurella multocida</i> com inibição do crescimento (seta) nas proximidades da estria de <i>Staphylococcus aureus</i> produtora de hialuronidase (satelitismo negativo), característico do tipo capsular A.	18
Figura 2 Teste de acriflavina. Reação flocular positiva (seta) de cultivo de <i>Pasteurella multocida</i> e acriflavina neutra (autoaglutinação) característica do tipo capsular D.	18
Figura 3 Teste de PCR <i>multiplex</i> . Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação: <i>hyaD-hyaC</i> (1.044pb, tipagem capsular A, seta preta), <i>dcbF</i> (657pb, tipagem capsular D, seta branca). Legenda: PM = marcador de peso molecular (100pb); 1 a 16 = amostras; P = controle positivo (mix dos tipos capsulares A e D); N = controle negativo (água ultrapura).	19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Pasteurelose pulmonar em suínos	12
2.1.1 Etiologia	12
2.1.2 Epidemiologia	13
2.1.3 Patogenia	14
2.1.4 Sinais Clínicos	15
2.1.5 Lesões macroscópicas e microscópicas	16
2.1.6 Diagnóstico	16
2.1.6.1 Tipificação da <i>P. multocida</i> em sorotipos A e D	17
2.1.7 Tratamento e prevenção	19
2.2 Resistência antimicrobiana	20
2.2.1 Tipos e mecanismos de resistência	21
2.2.2 Transferência dos genes de resistência	22
2.3 <i>Pasteurella multocida</i> e a resistência aos antimicrobianos	22
2.3.1 Testes de susceptibilidade antimicrobiana	23
2.3.2 Resistência à amoxicilina	24
2.3.3 Resistência à enrofloxacina	25
2.3.4 Resistência ao florfenicol	26
2.3.5 Resistência à tetraciclina	27
REFERÊNCIAS	28
3 ARTIGO I	38
3.1 INTRODUCTION	39
3.2 MATERIAL AND METHODS	40
3.2.1 Bacterial isolates	40
3.2.2 Minimum inhibitory concentration testing	41
3.2.3 Statistical analysis	42
3.3 RESULTS	42

3.4 DISCUSSION	44
3.5 CONCLUSIONS	46
REFERÊNCIAS.....	47
4 ARTIGO II	50
4.1 INTRODUCTION	52
4.2 MATERIALS AND METHODS	53
4.2.1 <i>Pasteurella multocida</i> isolates	53
4.2.2 <i>Phenotype testing</i>	54
4.2.3 <i>Multiplex PCR</i>	54
4.2.4 <i>Statistical analysis</i>	55
4.3 RESULTS	56
4.4 DISCUSSION	56
4.5 CONCLUSION	57
REFERENCES.....	58
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	60

1 INTRODUÇÃO

A *Pasteurella (P.) multocida* é uma bactéria de distribuição mundial e possui vários hospedeiros, como humanos, pássaros e outros animais (REGISTER et al., 2012). Em suínos, é considerada um agente residente do trato respiratório superior e pode ser isolada a partir das fossas nasais e das tonsilas de animais saudáveis (PIJOAN, 2006). Também pode estar presente em processos de pneumonias, pleurites e rinite atrófica progressiva. A pasteurelose pulmonar em suínos ocorre, normalmente, na fase final da infecção por *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* (pneumonia enzoótica), ou do complexo das doenças respiratórias dos suínos. É uma das doenças mais importantes na suinocultura (BOROWSKI et al., 2012; REGISTER et al., 2012), uma vez que causa impacto negativo no ganho de peso e na conversão alimentar dos animais (NOYES, 1990; PIJOAN, 2006).

Vários antimicrobianos e suas combinações podem ser usados no tratamento e/ou prevenção da pasteurelose pulmonar, como tetraciclina, amoxicilina, florfenicol, sulfatrimetoprima, tilmicosina e tulatromicina, entre outros (BARCELLOS & SOBESTIANSKY, 1998; PIJOAN, 2006). Uma vez que o uso de antimicrobianos pode contribuir para a seleção de bactérias resistentes (SCHWARZ et al., 2001), é importante fazer antibiograma antes de estabelecer o tratamento (NEUMANN et al., 2009). Todavia, como o processo de identificação e a realização do antibiograma pode levar vários dias, é comum recomendar o início do tratamento imediatamente (PIJOAN, 2006). Dessa forma, a escolha do antimicrobiano deve ser feita com base em resultados prévios, destacando então a importância de programas nacionais de monitoramento de resistência antimicrobiana (KEHRENBURG et al., 2001b).

No Brasil, poucos estudos sobre o perfil de resistência de *P. multocida* isolada de suínos foram encontrados na literatura (STEPAN, 1998; BOROWSKI et al., 2002; HERES, 2009; MORES et al., 2015). Na maioria desses estudos foi utilizada apenas a técnica de ágar difusão, o que permite um resultado apenas qualitativo, indicando se a bactéria em questão é suscetível, resistente ou de resistência intermediária. Além disso, em nenhum dos trabalhos encontrados na literatura nacional ou internacional (YOSHIMURA et al., 2001; SELLYEI et al., 2009; HABRUN et al., 2010; ESPINOSA et al., 2012; NEDBALCOVÁ &

KUCEROVÁ, 2013; PORTIS, et al., 2013; DAYAO et al., 2014; JONG et al., 2014; NEDBALCOVÁ et al., 2014) foi realizada uma comparação com base estatística das concentrações inibitórias mínimas (CMI) para isolados de *P. multocida* em diferentes períodos de tempo.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi determinar e comparar as CIMs de antimicrobianos para *P. multocida* utilizados em rebanhos suínos brasileiros em dois períodos diferentes: de 1981 a 1997 (isolados históricos) e de 2011 a 2012 (isolados contemporâneos). Dessa forma se procurou determinar o perfil de sensibilidade dos isolados de *P. multocida*, visando monitorar a evolução da resistência contra drogas utilizadas em programas preventivos e curativos para *P. multocida* na suinocultura brasileira. Paralelamente, foi realizado um estudo comparativo entre os métodos de tipificação capsular dos sorotipos A e D de isolados de *P. multocida* de suínos utilizando técnicas fenotípicas (hialuronidase e acriflavina) e genotípica (PCR *multiplex*).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pasteurelose pulmonar em suínos

2.1.1 Etiologia

Pasteurella multocida pertence à família *Pasteurellaceae*, sendo a maioria dos isolados de *P. multocida* de suínos pertencentes à subespécie *multocida*. É um cocobacilo ou bacilo Gram-negativo pequeno (0,3-1,0µm de largura e 1,0-2,0µm de comprimento), não móvel, anaeróbico facultativo e não esporulado (OLIVEIRA, 1994; MARKEY et al., 2013). Em relação ao cultivo, é nutricionalmente fastidiosa, crescendo melhor em meios suplementados (soro ou sangue) ou, ainda, em ágar chocolate, e não cresce em meios utilizados para enterobactérias, como o Ágar MacConkey (MARKEY et al., 2013).

A bactéria pode ser classificada com base em seus antígenos capsulares em cinco sorotipos: A, B, D, E e F (CARTER, 1955). Alguns isolados do trato respiratório não são encapsulados e, portanto, não tipificáveis (REGISTER et al., 2012). A cápsula bacteriana é composta por polissacarídeos altamente hidratados e desempenha importantes funções na sobrevivência e patogenia da bactéria, como resistência à dessecação (BOYCE et al., 2000), aderência na superfície da célula do hospedeiro (JACQUES et al., 1993) e evasão da fagocitose (TRUSCOTT & HIRSH, 1988). Assim, a perda dessa estrutura resulta em cepas menos patogênicas (CHUNG et al., 2001). Cada sorotipo capsular apresenta uma composição específica, sendo que o principal componente do tipo A é o ácido hialurônico (ROSNER et al., 1992). Em contraste, o tipo D é formado principalmente por heparina ou sulfato de heparina (DE ANGELIS & WHITE, 2002).

Cada sorotipo parece estar mais associado com determinada doença (BOYCE & ADLER, 2006). Dentre os sorotipos capsulares conhecidos, A, B, D e F já foram detectados em suínos, sendo A e D os mais frequentes (REGISTER et al., 2012). O sorotipo mais associado com pneumonias é o A (STEPAN, 1995; BOROWSKI et al., 2001; REGISTER et al., 2012), porém, nos últimos anos, vem aumentando o número de isolados do tipo D.

Esse aumento tem sido atribuído a fatores imunossupressores, como associações com micotoxinas e circovirus tipo 2 (PCV2) (HALLOY et al., 2005; TAYLOR, 1996).

2.1.2. Epidemiologia

A pasteurelose pulmonar em suínos ocorre, normalmente, como a fase final da infecção por *M. hyopneumoniae* (pneumonia enzoótica), ou do complexo das doenças respiratórias dos suínos, sendo uma das doenças mais importantes na suinocultura (REGISTER et al., 2012).

Pasteurella multocida está presente em todos os rebanhos suínos e pode ser isolada a partir das fossas nasais e das tonsilas de animais saudáveis. A transmissão por aerossóis já foi descrita, mas a rota naso-nasal parece ser a rota mais comum da infecção (PIJOAN, 2006). A transmissão pode ser vertical ou horizontal, sendo essa última a mais frequente (ZHAO et al., 1993). Roedores, gatos, cachorros e outros hospedeiros de *P. multocida* devem ser considerados possíveis fontes da bactéria (REGISTER et al., 2012).

A ocorrência de *P. multocida* em lesões pneumônicas em suínos é alta nos estudos realizados ao longo do tempo, sendo mais frequente em animais de crescimento e terminação (REGISTER et al., 2012). No Brasil, Stepan (1995) isolou *P. multocida* de 94 (53,93%) do total de 181 pulmões com lesões de pneumonia e/ou pleurite no Estado do Rio Grande do Sul. Em outro estudo sobre caracterização de lesões pulmonares responsáveis pelo desvio de carcaças realizado em frigorífico do Estado de Santa Catarina foi isolada *P. multocida* de 56% do total de 150 pulmões avaliados (MORES, 2006). Um trabalho realizado na Dinamarca observou uma ocorrência de 79% de *P. multocida* no total de 148 pulmões de suínos com lesões de broncopneumonia ao abate (HANSEN et al., 2010).

No Brasil, um estudo observacional identificou os seguintes fatores de risco para aumentar a ocorrência de pneumonias nas fases de crescimento e terminação (COSTA et al., 2000):

- Densidade superior a 15 suínos/baia e área menor que 0,85m²/suíno;
- Deficiência no controle da ventilação e da temperatura;
- Ausência de vazão sanitário entre lotes;

- Fornecimento de ração à vontade;
- Quantidade excessiva de moscas no primeiro mês de alojamento.

2.1.3 Patogenia

A patogenia de *P. multocida* é pouco conhecida, uma vez que, dentre outros fatores, a manipulação genética dessa bactéria começou apenas na década passada (WILKIE et al., 2012). As tonsilas parecem ser o sítio de colonização de *P. multocida*, a partir das quais a bactéria se difundiria para o trato respiratório inferior e superior dos suínos quando a resposta imune inata desses animais encontra-se comprometida (REGISTER et al., 2012). A coinfeção com outros agentes de doenças respiratórias, como o *M. hyopneumoniae*, assim como o tipo capsular são fatores importantes para a ocorrência de pasteurelose pneumônica (AMASS et al., 1994; REGISTER et al., 2012; TAKEUTI et al., 2013).

O papel da *P. multocida* como agente primário de pneumonia em suínos é bastante discutido, sendo que a maioria dos autores acredita que esse agente necessita da interação com outros agentes (*M. hyopneumoniae*, PCV2) para causar pneumonia (AMASS et al., 1994; BOROWSKI et al., 2012; REGISTER et al., 2012). No entanto, em 1990 foi proposto um modelo experimental para a indução de pneumonia em suínos por *P. multocida* do tipo A (HALL et al., 1990). No estudo realizado por Oliveira Filho et al. (2015) foi demonstrado que, em condições experimentais, certas cepas de *P. multocida* (“*Actinobacillus pleuropneumoniae*-like”) podem atuar como agente primário de doença respiratória caracterizada por lesões pulmonares e septicemia, sem associação com outros agentes como *M. hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, influenza vírus A, PCV2 e PRRS. Em outro estudo realizado por Park et al. (2016) foi demonstrado que *M. hyopneumoniae* causa alterações nos glicoconjugados e no epitélio ciliado das células pulmonares, produzindo assim um ambiente favorável para colonização e infecção por *P. multocida* em suínos.

Uma vez que *P. multocida* venha a se estabelecer, a bactéria estimula uma reação supurativa, caracterizada por infiltração neutrofílica. Essa é provavelmente uma reação aos

lipopolissacarídeos, que estimula a liberação de citocinas inflamatórias (PIJOAN, 2006). A reação inflamatória pode envolver ainda a pleura e o saco pericárdico. A presença de abscessos no pulmão pode ser observada como consequência de infartos localizados, ou pelo efeito necrótico de substâncias tóxicas produzidas por *P. multocida* ou outro agente bacteriano secundário (NEUMANN et al., 2009). A morte é incomum, sendo provavelmente resultante de choque séptico e insuficiência respiratória (PIJOAN, 2006).

2.1.4 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos variam de acordo com o isolado de *P. multocida* envolvido e a imunidade do animal. Já foram descritas três formas de infecção. A forma aguda, a mais rara, caracteriza-se por dispneia, respiração ofegante, respiração abdominal, prostração e febre (PIJOAN, 2006; OLIVEIRA FILHO et al., 2015). Num estudo realizado por Ciprian et al. (1988), foi observado que suínos infectados apenas com *P. multocida* não apresentaram sinais clínicos, ao passo que suínos infectados com apenas *M. hyopneumoniae* apresentou febre branda, tosse moderada e dispneia. Além disso, os animais inoculados com ambos, *P. multocida* e *M. hyopneumoniae* apresentaram quadros mais graves, com febre alta, tosse severa e dispneia.

Já na forma subaguda, é observada pleurite, caracterizando-se por tosse e respiração abdominal nos animais de crescimento e terminação. Essa forma pode ser confundida, clinicamente, com pleuropneumonia causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*. No entanto, a pasteurelose pulmonar se diferencia por não causar, com frequência, morte súbita (PIJOAN, 2006).

A forma crônica é a mais comum, caracterizando-se por tosse, respiração abdominal e febre baixa ou inexistente em animais do final de creche e crescimento (PIJOAN, 2006; NEUMANN et al., 2009). Os sinais clínicos dessa fase não podem ser diferenciados daqueles causados pelo *M. hyopneumoniae*, representando uma continuação ou exacerbação da micoplasmose primária (BOROWSKI et al., 2012).

2.1.5 Lesões macroscópicas e microscópicas

As lesões de pasteurelose pulmonar são limitadas à cavidade torácica, sendo típica a consolidação anteroventral do pulmão e espuma na traqueia (TAYLOR, 1996). A porção afetada do pulmão apresenta-se com alterações de cor e, em muitos casos, há vários graus de pleurite e formação de abscessos (STEPAN, 1995; REGISTER et al., 2012; OLIVEIRA FILHO et al., 2015). Também são comuns aderências da pleura na parede torácica, que se apresenta translúcida e seca, o que pode ajudar na diferenciação de lesões causadas pelo *Actinobacillus pleuropneumoniae*, que apresenta pleurite mais severa (BOROWSKI et al., 2012).

Histologicamente observa-se broncopneumonia exsudativa, hiperplasia epitelial alveolar e presença abundante de neutrófilos no lúmen bronquial e espaço alveolar (PIJOAN, 2006; OLIVEIRA FILHO et al., 2015). Além disso, pode ser observada nefrite intersticial associada à broncopneumonia, faringite necrótica, poliartrite fibrinosa e meningite (BOROWSKI et al., 2012). Um estudo realizado no Brasil mostrou que cepas de *P. multocida* tipo A (“*Actinobacillus pleuropneumoniae*-like”) podem apresentar diferentes perfis patogênicos, como focos necrohemorrágicos no pulmão e lesões septicêmicas, o que pode ser explicado pela diferença genética dos isolados (OLIVEIRA FILHO, 2014).

2.1.6 Diagnóstico

Uma vez que as lesões causadas pela *P. multocida* não são patognomônicas, não podem ser usadas como único critério para estabelecer o diagnóstico definitivo. Deve-se levar em consideração o histórico de surtos do rebanho, a histopatologia e o isolamento e caracterização do patógeno (PIJOAN, 2006; NEUMANN et al., 2009). Para uma maior chance de isolamento, as melhores amostras são suabes de exsudato bronqueotraqueal e tecido pulmonar afetado (PIJOAN, 2006; HERES, 2009).

Em relação ao exame bacteriológico, as colônias são normalmente arredondadas, acinzentadas, não hemolíticas, mucoides e de superfície lisa e brilhante. São normalmente evidentes após 24 horas de incubação a 37°C e possuem odor adocicado (MARKEY et al.,

2013; OLIVEIRA, 1994). A identificação presuntiva de *P. multocida* pode ser feita a partir das seguintes características fenotípicas: catalase positiva, oxidação positiva a fraca, produção de ácido sulfídrico, indol positiva, motilidade negativa, citrato negativa, manitol positiva, maltose e arabinose negativa, xilose e trealose variáveis (MARKEY et al., 2013; REGISTER et al., 2012).

Além do cultivo bacteriológico, outras técnicas podem ser usadas no diagnóstico de *P. multocida*, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), imunohistoquímica (IHQ) e hibridização *in situ* de fluorescência (FISH) (MBUTHIA et al., 2001; TOWNSEND et al., 2001; TAKEUTI et al., 2013).

O diagnóstico diferencial deve ser feito para outros agentes, como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, vírus da influenza, *M. hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica* e *Streptococcus* sp. (pneumonias); *Streptococcus* sp. e *Arcanobacterium pyogenes* (abscessos); *Haemophilus parasuis* e *Mycoplasma hyorhinis* (pleurites) (REGISTER et al., 2012).

2.1.6.1 Tipificação da *P. multocida* em sorotipos A e D

A classificação da *P. multocida* com base na antigenicidade capsular foi determinada, inicialmente, a partir de testes de hemaglutinação passiva (CARTER, 1955). No entanto, esse método caiu em desuso, uma vez que demanda antissoros específicos para cada tipo capsular e mais tempo para execução (RIMLER, 1978).

Cartel & Rundell (1975) desenvolveram um teste para reconhecer as cepas do tipo A através da despolarização da cápsula após crescimento nas proximidades de uma cepa de *Staphylococcus aureus* produtora de hialuronidase, fenômeno conhecido como satelitismo negativo (Figura 1). Para reconhecer as cepas do tipo D, Carter & Subronto (1973) desenvolveram uma técnica baseada na reação flocular das cepas que são suspensas numa solução de acriflavina (Figura 2). Além dessas técnicas fenotípicas, Townsend et al. (2001) desenvolveu uma PCR *multiplex* para detecção dos genes de tipagem capsular *hyaD-hyaC* (tipagem capsular A) e *dcbF* (tipagem capsular D) (Figura 3).

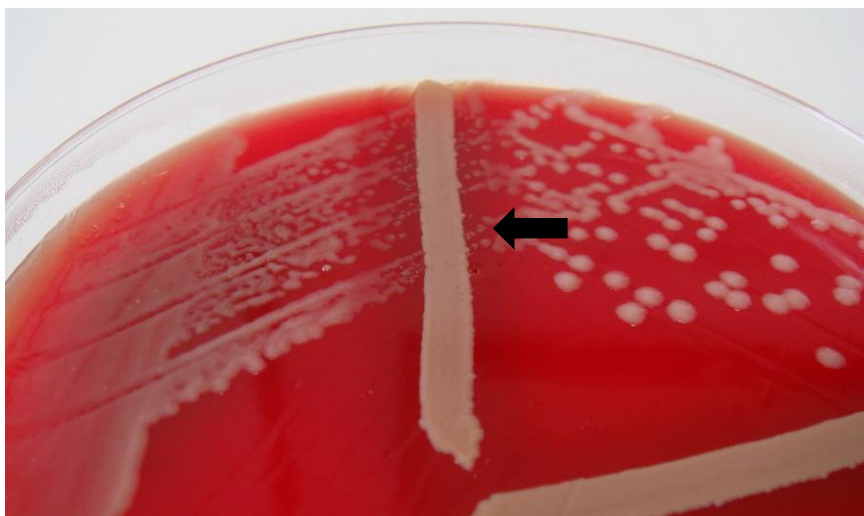


Figura 1 - Teste de hialuronidase. Colônias de *Pasteurella multocida* com inibição do crescimento (seta) nas proximidades da estria de *Staphylococcus aureus* produtora de hialuronidase (satelitismo negativo), característico do tipo capsular A. Fonte: Heres (2009).



Figura 2 - Teste de acriflavina. (A) Reação flocular negativa. (B) Reação flocular positiva (seta) de cultivo de *Pasteurella multocida* e acriflavina neutra (autoaglutinação) característica do tipo capsular D.

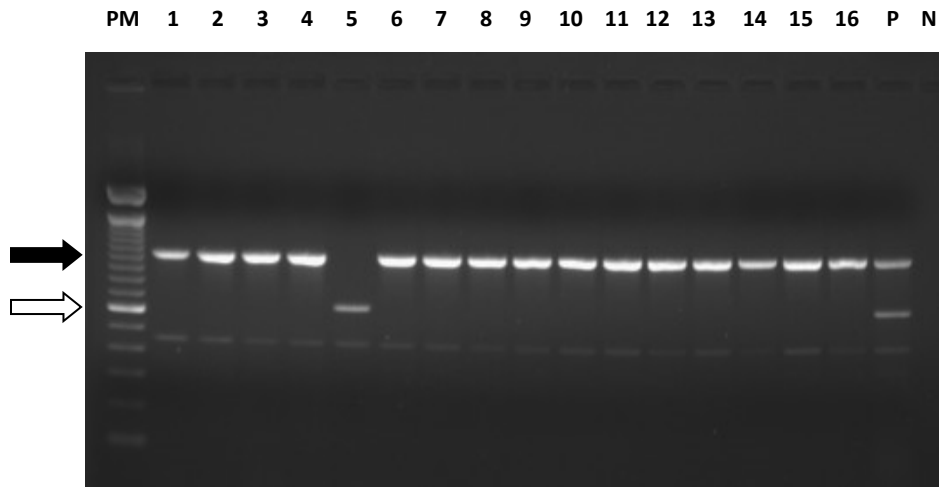


Figura 3 - Teste de PCR *multiplex*. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação: *hyaD-hyaC* (1.044pb, tipagem capsular A, seta preta), *dcbF* (657pb, tipagem capsular D, seta branca). Legenda: PM = marcador de peso molecular (100pb); 1 a 16 = amostras; P = controle positivo (mix dos tipos capsulares A e D); N = controle negativo (água ultrapura).

2.1.7 Tratamento e prevenção

Vários antimicrobianos e suas combinações poderiam ser usados no tratamento e/ou prevenção da pasteurelose pulmonar, como tetraciclina, amoxicilina, florfenicol, sulfatrimetoprima, tilmicosina e tulatromicina, entre outros (BARCELLOS & SOBESTIANSKY, 1998; PIJOAN, 2006).

O tratamento, normalmente, é feito por via parenteral, podendo ser usada também a medicação na água ou ração para os lotes afetados. Outra possibilidade seria uma atuação de forma preventiva. Para tal, podem ser usados medicamentos na forma de pulsos (BURCH, 2013). Uma vez que a *P. multocida* já pode ser resistente a alguns antimicrobianos, é importante fazer um antibiograma antes de estabelecer o tratamento (NEUMANN et al., 2009). Todavia, como o processo de identificação e a realização do antibiograma pode levar vários dias, é comum recomendar o início do tratamento imediatamente (PIJOAN, 2006). A escolha do antimicrobiano é feita, portanto, com base

em resultados prévios, destacando então a importância de programas nacionais de monitoramento de resistência antimicrobiana (KEHRENBERG et al., 2001b).

Em relação ao uso preventivo de vacinas, existem vários tipos (cultivos bacterianos totais inativados, endotoxinas, etc.), sendo que as bacterinas adicionadas de adjuvante vem apresentando bons resultados no Brasil (BOROWSKI et al., 2012). Entretanto, essa vacina só induz imunidade ao sorotipo somático homólogo (ADLER et al., 1996), o que indica em muitos casos a necessidade do uso de uma vacina autógena. A falta de conhecimento sobre a patogenia de *P. multocida* no desenvolvimento da pasteurelose pulmonar, bem como a dificuldade de reprodução experimental da doença contribui para o insucesso da vacinação para essa doença (HAESEBROUCK et al., 2004).

Como complemento à prevenção, devem ser adotados manejos que melhorem a saúde animal de uma forma geral, não sendo específicos para a *P. multocida*. Dentre esses manejos, podemos citar o manejo “todos dentro, todos fora”, menor mistura de animais de diferentes origens, evitar a superlotação das baias e a diminuição do tamanho das baias e, conseqüentemente, do número de animais (PIJOAN, 2006; NEUMANN et al., 2009). A correção dos fatores de risco descritos anteriormente (item 2.1.2 Epidemiologia) é importante para o controle e/ou prevenção da doença. Em situações mais graves, além da correção dos fatores de risco, pode haver necessidade de instituir um esquema de tratamento antimicrobiano (BOROWSKI et al., 2012).

De maneira geral, o controle de infecções por *P. multocida* é considerado difícil, principalmente, por três razões: na maioria das vezes *P. multocida* não é o único agente envolvido; existe uma resistência significativa a alguns antimicrobianos; dificuldade de atingir concentrações terapêuticas no pulmão consolidado devido à pneumonia (KEHRENBERG et al., 2001b; PIJOAN, 2006).

2.2 Resistência antimicrobiana

2.2.1 Tipos e mecanismos de resistência

Há dois tipos principais de resistência antimicrobiana: intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca é a resistência natural de determinada bactéria, que está relacionada, na maioria das vezes, com sua estrutura, como a falta ou a inacessibilidade dos receptores para os antimicrobianos, ou características metabólicas (BOERLIN & WHITE, 2013).

A resistência adquirida representa a maior parte dos problemas de resistência observados em Medicina Veterinária (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). Existem três formas principais de aquisição de genes de resistência entre bactérias que serão descritas a seguir. A primeira forma é a aquisição a partir do microorganismo produtor do antibiótico. A segunda forma consiste na mutação de genes, enquanto que a terceira forma consiste na modificação dos receptores dos antimicrobianos nas bactérias (ALEKSHUN & LEVY, 2000 apud SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001; TONEVER, 2006).

Os mecanismos de resistência antimicrobiana podem ser classificados em quatro categorias, como descrito a seguir (DZIDIC et al., 2008; BOERLIN & WHITE, 2013). (1) diminuição da permeabilidade celular: o antimicrobiano não atingirá seu receptor na célula alvo; (2) bomba de efluxo: o antimicrobiano é expulso da célula alvo; (3) modificação do antimicrobiano: o antimicrobiano é inativado por modificação ou degradação antes ou depois de penetrar na célula alvo; (4) modificação do receptor: o receptor da célula alvo pode ser modificado ou protegido, de forma que os antimicrobianos não tem acesso aos mesmos.

A administração de antimicrobianos em animais pode contribuir para a seleção de bactérias resistentes (SCHWARZ et al., 2001). Essa resistência pode ser definida microbiologicamente como sendo um isolado que consegue se multiplicar *in vitro* em concentrações de antimicrobianos maiores do que determinado ponto de corte de acordo com critérios previamente estabelecidos (SCHWARZ et al., 2010). Já a definição clínica considera uma cepa resistente quando a terapia antimicrobiana adotada no animal (*in vivo*) não resulta na eliminação do agente (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001).

2.2.2 Transferência dos genes de resistência

Os genes de resistência podem ser transferidos por diferentes mecanismos. No caso da transferência vertical, o gene é transferido no momento da divisão celular (BENNETT, 1995 apud SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). Já a transferência horizontal pode ocorrer por meio de transformação, transdução e conjugação (LEVY & MARSHALL, 2004). A transformação consiste na incorporação de genes de resistência de outras bactérias presentes no meio. No entanto, apenas algumas bactérias possuem a capacidade de fazer tal incorporação (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). Na transdução, o gene de resistência é transferido de uma bactéria para outra por meio de um bacteriófago, que injeta seu DNA no interior da celular alvo. Na conjugação, o gene de resistência é transferido por meio de plasmídeo ou transposon através de uma ponte citoplasmática entre duas bactérias (ALBENNETT, 1995 apud SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001; ALEKSHUN & LEVY, 2007). É provável que a transferência desses plasmídeos possa ocorrer entre bactérias de diferentes espécies e gêneros que compartilham de um mesmo habitat (KEHRENBURG et al., 2001a).

Dentre essas formas de transferência de resistência, a transdução e a transformação são mais comuns em bactérias Gram-positivas, enquanto que as bactérias Gram-negativas podem possuir qualquer uma das formas, sendo mais frequente a conjugação (SPINOSA, 2006).

2.3 *Pasteurella multocida* e a resistência aos antimicrobianos

As principais formas de uso dos antimicrobianos para controle e/ou prevenção de infecções por *P. multocida*, assim como para outras infecções em animais de produção, são as formas terapêutica ou metafilática, quando o animal já adoeceu, e a forma profilática, visando evitar que os animais adoeçam em determinado período em que os mesmos, normalmente, são acometidos (BURCH, 2013).

A resistência antimicrobiana da *P. multocida* pode variar de acordo com uma série de fatores, tais como o acesso dos isolados a genes de resistência e a transferência

horizontal desses genes; metodologia dos testes de suscetibilidade e critérios de interpretação de comitês competentes de diferentes países (KEHRENBURG et al., 2001b).

2.3.1 Testes de susceptibilidade antimicrobiana

Diversos trabalhos sobre a resistência da *P. multocida* já foram realizados em vários países através de testes de suscetibilidade antimicrobiana (BOROWSKI et al., 2002; HERES, 2009; PORTIS et al., 2013). Esses testes são úteis para monitorar a evolução do perfil de resistência de drogas utilizadas em programas preventivos e curativos para *P. multocida*, visando verificar a eficácia do uso de antimicrobianos na suinocultura. Embora possa existir diferença no perfil de sensibilidade entre testes *in vitro* e *in vivo*, os testes *in vitro* fornecem informações importantes sobre a eficiência ou não dos antimicrobianos (SCHWARZ et al., 2001).

São vários os testes utilizados para medir a resistência bacteriana frente aos antimicrobianos, sendo os mais frequentes para *P. multocida* os testes de disco-difusão (STEPAN et al., 1998; BOROWSKI et al., 2002; SELLYEI et al., 2009; HABRUN et al., 2010; ESPINOSA et al., 2012) e o de micro-diluição em caldo (NEDBALCOVÁ & KUCEROVÁ, 2013; PORTIS, et al., 2013; DAYAO et al., 2014; JONG et al., 2014; NEDBALCOVÁ et al., 2014; MORES et al., 2015). Apesar do teste de disco-difusão ser considerado mais simples, prático e de baixo custo quando comparado com o teste de micro-diluição em caldo, fornece um resultado apenas qualitativo, indicando se a bactéria é suscetível, resistente ou de resistência intermediária. Por outro lado, o teste de micro-diluição em caldo fornece um resultado quantitativo, por meio da concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos testados (JORGENSEN & FERRARO, 2009).

A avaliação da susceptibilidade bacteriana *in vitro* para uso terapêutico deve ser feita de acordo com normas e critérios previamente estabelecidos por órgãos de referência, como o "Clinical and Laboratory Standards Institute" - CLSI, visando padronizar a metodologia e os critérios de interpretação dos resultados desses testes. Dessa forma, os resultados poderão ser considerados fidedignos e comparáveis com outros estudos que também seguirem as mesmas normas e critérios (RUBIN, 2013). Os critérios de

interpretação da CIM adotados pelo CLSI são estabelecidos através da análise de três tipos de dados: dados microbiológicos, que inclui a comparação dos MICs de um grande número de cepas bacterianas; dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos; e resultados de estudos clínicos (CLSI, 2008 apud JORGENSEN & FERRARO, 2009). Baseados nesses critérios, os resultados dos testes de susceptibilidade podem se apresentar como suscetível, intermediário e resistente. Um isolado suscetível indica alta probabilidade de sucesso com uso da droga testada (RUBIN, 2013).

2.3.2 Resistência à amoxicilina

A amoxicilina pertence à classe dos beta-lactâmicos. É uma penicilina semi-sintética de segunda geração, ácido estável, podendo ser absorvida quando usada por via oral. Atua em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas inibindo a síntese da parede celular por meio da inibição de determinadas enzimas (proteínas de ligação às penicilinas) localizadas na parte externa da membrana citoplasmática, tendo efeito bactericida (SPINOSA, 2006; PRESCOTT, 2013). Por ter excelente absorção intestinal, a amoxicilina consegue atingir altos níveis teciduais, tendo assim bom efeito clínico (PRESCOTT, 2013).

A resistência aos beta-lactâmicos, no caso das bactérias Gram-positivas, ocorre, principalmente, pela produção de beta-lactamases (ALEKSHUN & LEVY, 2000 apud SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). Já bactérias Gram-negativas possuem características que favorecem a resistência às penicilinas: baixa permeabilidade da parede celular, carência de proteínas que se ligam às penicilinas e grande variedade de enzimas beta-lactamases (PRESCOTT, 2013). Além disso, a resistência pode ocorrer devido à diminuição de interação entre beta-lactâmicos e seus receptores que ocorre tanto pela redução da sua internalização, quanto pelo aumento da sua eliminação da célula bacteriana devido a alterações na membrana celular (QUINTILIANI et al., 1999 apud SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). Plasmídeos que possuem genes de resistência aos beta-lactâmicos estão amplamente difundidos entre as bactérias Gram-negativas (KARRIKER et al., 2012; PRESCOTT, 2013).

Na suinocultura brasileira, a amoxicilina foi introduzida em 1995 e é o antimicrobiano mais frequentemente usado pela via oral, na forma de pulsos, para prevenção de doenças causadas pela *P. multocida*. Borowski et al. (2002) testaram 24 isolados de *P. multocida* de suínos do Rio Grande do Sul quanto à suscetibilidade à antimicrobianos. Foi observado que 12,51% dos isolados eram resistentes à amoxicilina pelo método de disco difusão. Alguns anos depois, Heres (2009) avaliou a suscetibilidade de 84 isolados de *P. multocida*, também de suínos do Rio Grande do Sul. Nesse estudo foi observado que apenas 2,38% dos isolados eram resistentes à amoxicilina. Resultado semelhante foi observado por Jong et al. (2014), que testaram a suscetibilidade de 230 isolados de *P. multocida* de suínos provenientes de 11 países europeus. Foi observado 1,3% de resistência e 0,25 µg/mL de MIC 90 para amoxicilina pelo teste de microdiluição em caldo. Recentemente, foram publicados resultados da avaliação de suscetibilidade de 24 isolados de *P. multocida* de suínos originados das principais regiões produtoras do Brasil (MORES et al., 2015). Foi observado que 20% dos isolados eram resistentes à amoxicilina.

2.3.3 Resistência à enrofloxacina

A enrofloxacina é um quimioterápico que pertence à classe das quinolonas. É uma quinolona de segunda geração (fluorquinolona) com amplo espectro de ação, cuja atividade está relacionada com a inibição da síntese do DNA por meio da inibição das enzimas topoisomerases do tipo II (DNA girase) e IV, tendo efeito bactericida (BAMBEKE et al., 2005; SPINOSA, 2006).

A resistência a esse quimioterápico é atribuída a modificações no sítio alvo e na permeabilidade da droga (ALEKSHUN & LEVY, 2000 apud SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). Alteração no sítio alvo é decorrente de mutações nos genes cromossomais que codificam as topoisomerases II e IV, resultando em menor afinidade pelas quinolonas (BAMBEKE et al., 2005). A resistência às quinolonas, na maioria das vezes, surge de forma gradual, a medida que há um acúmulo dessas mutações nos genes cromossomais (SANDERS, 2001). As mutações correspondem a erros durante a duplicação do DNA e ocorrem em frequência que varia de uma em 10⁶ até uma em 10⁹ bactérias

“selvagens” (SANDERS, 2001). Alterações da permeabilidade às quinolonas estão relacionadas com a diminuição do influxo da droga por meio da diminuição das porinas, e pelo aumento da eliminação da mesma por meio das bombas de efluxo (GIGUÈRE & DOWLING, 2013). Nas bactérias Gram-negativas, essas porinas são representadas pela proteína de membrana F (OmpF), que é uma importante porta de entrada para as quinolonas (QUINTILIANI et al., 1999 apud SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). No entanto, esse mecanismo não leva à resistência de importância clínica, sendo necessário a associação com outros mecanismos de resistência (BAMBEKE et al., 2005). Segundo Giguère & Dowling (2013), a resistência a uma fluorquinolona normalmente resulta na resistência a todos os antimicrobianos dessa classe. Além disso, microrganismos resistentes às quinolonas, por meio de alteração de permeabilidade à droga, podem apresentar reação de resistência cruzada com antimicrobianos de outros grupos, como cefalosporinas, clorfenicol e tetraciclinas (SPINOSA, 2006).

No Brasil, a enrofloxacinina foi introduzida em 1988, sendo usada, principalmente, por via intramuscular no tratamento de infecções bacterianas intestinais, respiratórias e urinárias (BARCELLOS & SOBESTIANSKY, 1998). Borowski et al. (2002) observaram que 25% do total de 24 isolados brasileiros de *P. multocida* eram resistentes à enrofloxacinina. No entanto, estudos realizados posteriormente demonstraram resistência em apenas 2% e 0% de isolados brasileiros (HERES, 2009; MORES et al., 2015, respectivamente). Da mesma forma, na República Checa, Nedbalcova & Kucerová (2013) testaram a suscetibilidade de 332 isolados de *P. multocida* de suínos e observaram que apenas 1,5% foram resistentes à enrofloxacinina no teste de microdiluição em caldo.

2.3.4 Resistência ao florfenicol

O florfenicol é um quimioterápico pertencente à classe dos cloranfenícolos. Possui efeito bacteriostático e amplo espectro de ação, sendo usado apenas em Medicina Veterinária (SCHWARZ et al., 2001). Atua inibindo a síntese proteica, ligando-se à subunidade 50 S do ribossoma bacteriano e bloqueando a enzima peptidil-transferase e, assim, impedindo o alongamento da cadeia de peptídeos (DOWLING, 2013).

A resistência aos cloranfenícolis, na maioria das vezes, é mediada por plasmídeos, responsáveis pela produção da enzima cloranfenicol-acetil-transferase, que inativa o cloranfenicol (YAMAMOTO et al., 1990 apud KEHRENBERG et al., 2001b; SPINOSA, 2006). Porém, a presença de flúor na molécula do florfenicol impede a atuação dessa enzima, fazendo com que as cepas bacterianas resistentes ao cloranfenicol sejam sensíveis ao florfenicol (CANNON et al., 1990 apud SCHWARZ et al., 2004). Gene de resistência ao florfenicol foi recentemente identificado em isolado de *P. multocida* de suíno na Alemanha (KEHRENBERG et al., 2008).

Na suinocultura brasileira o florfenicol foi introduzido em 1999 e seu principal uso tem sido por via oral, na forma de pulsos, para prevenção de doenças respiratórias crônicas causadas por bactérias Gram-negativas não-entéricas como *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Haemophilus parasuis* (BARCELLOS & SOBESTIANSKY, 1998). Estudos realizados com isolados de *P. multocida* do Brasil, Estados Unidos, Canadá e Alemanha mostram que essa bactéria ainda é pouco resistente ao florfenicol (KEHRENBERG et al., 2004; SHIN et al., 2005; PORTIS et al., 2013; MORES et al., 2015).

2.3.5 Resistência à tetraciclina

A tetraciclina pertence à classe das tetraciclinas, que são antibióticos bacteriostáticos de amplo espectro de ação e um dos mais usados na Veterinária (DEL CASTILLO, 2013). Atua na inibição da síntese proteica dos microrganismos sensíveis ligando-se à subunidade 30 S do ribossoma bacteriano e impedindo que o RNA-transportador se fixe ao ribossoma (SPINOSA, 2006; DEL CASTILLO, 2013).

A resistência à tetraciclina se dá por diferentes mecanismos, principalmente: (1) proteínas de efluxo; (2) proteínas protetoras de ribossoma; e (3) inativação enzimática (ROBERTS, 1996). Essa resistência está extremamente difundida (KARRIKER et al., 2012) e já foram descritos dois genes de resistência à tetraciclina (*tetB* e o *tetH*), localizados em plasmídeos ou cromossoma (KEHRENBERG et al., 2001a).

No Brasil, a tetraciclina foi introduzida em 1960 e, inicialmente, foi amplamente usada para prevenção e tratamento de infecções do trato respiratório superior e inferior (BARCELLOS & SOBESTIANSKY, 1998). No entanto, seu uso terapêutico tem sido pouco realizado no Brasil, em função do alto nível de resistência que vem sendo observado em antibiogramas realizados com isolados de suínos. Stepan et al. (1998) testou a suscetibilidade de 97 isolados de *P. multocida* de suínos em quatro frigoríficos do Estado do Rio Grande do Sul. Do total de isolados testados, 28,87% foram considerados resistentes à tetraciclina pelo método de ágar difusão. Outro estudo realizado na Austrália, que testou 51 isolados de *P. multocida* de suínos entre 2002 e 2013, observou que 28% eram resistentes à tetraciclina (DAYAO et al., 2014).

REFERÊNCIAS

ADLER, B.; CHANCELLOR, R.; HAMCHAMPA, P.; HUNT, M.; RUFFOLO, C.; STRUGNELL, R.; WAPLING, D. Immunity and vaccine development in *Pasteurella multocida* infections. **Journal of Biotechnology**, v. 44, p. 139-144, 1996.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, p.1037-1050, 2007.

AMASS, S. F.; CLARK, L. K.; VAN ALSTINE, W. G.; BOWERSOCK, T. L.; MURPHY, D. A.; KNOX, K. E.; ALBREGTS, S. R. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 204, p. 102-107, 1994.

BAMBEKE, F. V.; MICHOT, J. M; ELDERE, J. V.; TULKENS, P. M. Quinolones in 2005: an update. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, p. 256-280, 2005.

BARCELLOS, D. E. S. N; SOBESTIANSKY, J. **Uso de antimicrobianos em Suinocultura**. Goiânia: Art 3 Impressos Especiais, 1998. 107 p.

BOERLIN, P.; WHITE, D. G. Antimicrobial resistance and its epidemiology. In: GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. (Eds.). **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 5. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2013. p. 21-40.

BOROWSKI, S. M. **Caracterização e estudo de virulência de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos no estado do RS, Brasil.** 2001. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

BOROWSKI, S. M.; BARCELLOS, D.; MORÉS, N. Pasteurelose pulmonar. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D (Eds.). **Doenças dos suínos.** 2. ed. Goiânia: Cãnone editora, 2012. p. 235-240.

BOROWSKI, S. M.; BARCELLOS, D. E. S. N.; RAZIA, L. E.; COUTINHO, T. A. Padrão de resistência antimicrobiana de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas em pulmões de suínos. **Revista da FZVA Uruguaiana**, v. 9, n. 1, p. 104-110, 2002.

BOYCE, J. D.; ADLER, B. How does *Pasteurella multocida* respond to the hostenvironment? **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 117-122, 2006.

BOYCE, J. D.; CHUNG, J. Y.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. **Journal of Biotechnology**, v. 83, p. 153-160, 2000.

BURCH, D. G. S. Antimicrobial drug use in swine. In: GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. (Eds.). **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.** 5. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2013. p. 553-568.

CARTER, G. R. Studies on *Pasteurella multocida* I. A haemoagglutination test for the identification of serological types. **American Journal of Veterinary Research**, v.16, p. 481-484, 1955.

CARTER, G. R.; RUNDELL, D. W. Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase. **Veterinary Record**, v. 87, p. 343, 1975.

CARTER, G. R.; SUBRANTO, P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, p. 293-294, 1973.

CHUNG, J. Y.; WILKIE, I.; BOYCE, J. D.; TOWNSEND, K. M.; FROST, A. J.; GHODDUSI, M.; ADLER, B. Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 2487–2492, 2001.

CIPRIAN, A; PIJOAN, C; CRUZ, T; CAMACHO, J; TOTORA, J; COLMENARES, G; LOPEZ-REVILLA, R; DE LA GARZA, M. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 434–438, 1988.

COSTA, O. A. D.; MORÉS, N.; SOBESTIANSKY, J.; BARIONI, W.; PIFFER, I. A.; PAIVA, D. P.; AMARAL, A. L.; GUZZO, R.; LIMA, G. J. M. M.; PERDOMO, C. C. Fatores de risco associados à rinite atrófica progressiva e pneumonias crônicas nas fases de crescimento e terminação. **Comunicado Técnico**, 267. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2000. 5 p.

DAYAO, D. A. E.; GIBSON, J. S.; BLACKALL, P. J.; TURNI, C. Antimicrobial resistance in bacteria associated with porcine respiratory disease in Australia. **Veterinary Microbiology**, v. 171, p. 232-235, 2014.

DE ANGELIS, P. L.; WHITE, C. L. Identification and molecular cloning of a heparosan synthase from *Pasteurella multocida* type D. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 7209-7213, 2002.

DEL CASTILLO, J. R. E. Tetracyclines. In: GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. (Eds.). **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 5. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2013. p. 257-268.

DOWLING, P. M. Chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol. In: GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. (Eds.). **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 5 ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2013. p. 269-277.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, p. 11-21, 2008.

ESPINOSA, I.; BÁEZ, M.; VICHI, J.; MARTÍNEZ, S. Antimicrobial resistance and genes associated to the host-microbe interaction of *Pasteurella multocida* isolates from swine in Western Cuba. **Revista de Salud Animal**, v. 34, n. 3, p. 151-158, 2012.

GIGUÈRE, S.; DOWLING, P. M. Fluoroquinolones. In: GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. (Eds.). **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 5. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2013. p. 295-314.

HABRUN, B.; KOMP, G.; CVETNĆ, Z.; SPICIĆ, S.; BENIĆ, M.; MITAK, M. Antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from diagnostic samples from large pig breeding farms in Croatia. **Veterinarski Arhiv**, v. 80, n. 5, p. 571-583, 2010.

HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; CHIERS, K.; MAES, D.; DUCATELLE, R.; DECOSTERE, A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? **Veterinary Microbiology**, v. 100, p. 255–268, 2004.

HALL, W. F.; BANE, D. P.; KILROY, C. R.; SORLIE, D. L. E. A Model for the induction of *Pasteurella multocida* type-A pneumonia in pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 238-243, 1990.

HALLOY, D. J.; GUSTIN, P. G.; BOUHET, S.; OSWALD, I. P. Oral exposure to culture material extract containing fumonisins predisposes swine to the development of pneumonitis caused by *Pasteurella multocida*. **Toxicology**, v. 213, 34-44, 2005.

HANSEN, M. S.; PORS, S. E.; JESSEN, H. E.; BILLE-HANSEN, V.; BISGAARD, M.; FLACHS, E. M.; NIELSEN, O. L. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, p. 120-131, 2010.

HERES, T. S. **Caracterização de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de lesões pneumônicas associadas ou não com circovirose em suínos**. 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

JACQUES, M.; KOBISCH, M.; BÉLANGER, M.; DUGAL, F. Virulence of capsulated and noncapsulated isolates of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucus. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 11, p. 4785-4792, 1993.

JONG, A.; THOMAS, V.; SIMJEE, S.; MOYAERT, H.; GARCH, F.; MAHER, K.; MORRISSEY, I.; BUTTY, P.; KLEIN, U.; MARION, H.; RIGAUT, D.; VALLÉ, M. Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: The VetPath study. **Veterinary Microbiology**, v. 172, p. 202-215, 2014.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Medical Microbiology**, v. 49, p. 1749-1755, 2009.

KARRIKER, L. A.; COETZEE, J.; FRIENDSHIP, R. M.; PRESCOTT, J. F. Drug pharmacology, therapy, and prophylaxis. In: ZIMMERMAN J. J., KARRIKER L. A., RAMIREZ A., SCHWARTZ K. J.; STEVENSON G. W. (Eds.). **Diseases of Swine**. 10. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2012. p. 106-118.

KEHRENBERG, C.; JURGEN MUMME, J.; WALLMANN, J.; VERSPOHL, J.; REGINA TEGELER, R.; TILMAN KUHN, T.; SCHWARZ, S. Monitoring of florfenicol susceptibility among bovine and porcine respiratory tract pathogens collected in Germany during the years 2002 and 2003. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 2004.

KEHRENBERG, C.; SALMON, S. A.; WATTS, J. L.; SCHWARZ, S. Tetracycline resistance genes in isolates of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosidal* and *Mannheimia varigena* from bovine and swine respiratory disease: intergeneric spread of the *tet(H)* plasmid pMHT1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 631-640, 2001a.

KEHRENBERG, C.; SCHULZE-TANZIL, G.; MARTEL, J.; CHASLUS-DANCLA, E.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. **Veterinary Research**, v. 32, p. 323-339, 2001b.

KEHRENBERG, C.; WALLMANN, J.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of florfenicol-resistant *Pasteurella multocida* isolates in Germany. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 951-955, 2008.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. 122-129, 2004.

MARKEY, B.; LEONARD, F.; ARCHAMBAULT, M.; CULLINANE, A.; MAGUIRE, D. *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Bibersteinia* and *Avibacterium* species. In: MARKEY B., LEONARD F., ARCHAMBAULT M., CULLINANE A. & MAGUIRE D. (Eds.). **Clinical Veterinary Microbiology**. 2. ed. Toronto: Elsevier, 2013. p. 307-316.

MBUTHIA, P. G.; CHRISTENSEN, H.; BOYE, M.; PETERSEN, K. M. D.; BISGAARD, M.; NYAGA, P. N.; OLSEN, J. E. Specific detection of *Pasteurella multocida* in chickens with fowl cholera and in pig lung tissues using fluorescent rRNA in situ hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2627-2633, 2001.

MORES, M. A. Z. **Anatomopatologia e bacteriologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaças em suínos**. 2006. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MORES, M. A. Z.; OLIVEIRA FILHO, J. X.; REBELATTO, R.; KLEIN, C.; BARCELLOS, D. E. N.; COLDEBELLA, A.; MORES, N. Aspectos patológicos e microbiológicos das doenças respiratórias em suínos de terminação no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 725-733, 2015.

NEDBALCOVÁ, K.; KUČEROVÁ, Z. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* isolates associated with porcine pneumonia. **Acta Veterinaria Brno**, v. 82, p. 003-007, 2013.

NEDBALCOVÁ, K.; NECHVATALOVA, K.; POKLUDOVA, L.; BURES, J.; KUCEROVA, Z.; KOUTECKA, L.; HERA, A. Resistance to selected beta-lactam antibiotics. **Veterinary Microbiology**, v. 171, p. 328-336, 2014.

NEUMANN, E. J.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J. Pneumonic pasteurellosis. In: NEUMANN, E. J.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J. (Eds.) **Swine disease manual**. 4. ed. Ames: American Association of Swine Veterinarians, 2009. p. 31-32.

NOYES, E.; FEENEY, D.; PIJOAN, C. Comparison of the effect of pneumonia detected during a lifetime with pneumonia detected at slaughter on growth in swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, p. 1025-1029, 1990.

OLIVEIRA FILHO, J. X. **Estudo da Patogenia e desenvolvimento de métodos de diagnóstico da pasteurelose pneumônica em suínos**. 2014. 123 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

OLIVEIRA FILHO, J. X.; MORES, M. A. Z.; REBELATTO, R.; AGNOL, A. M. D.; PLIESKI, C. L. A.; KLEIN, C. S.; BARCELLOS, D. E. S. N.; MORES, N. *Pasteurella multocida* type A as the primary agent of pneumonia and septicaemia in pigs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 716-724, 2015.

OLIVEIRA, S. J. *Pasteurella*. In: OLIVEIRA, S. J. (Ed.). **Guia bacteriológico prático: microbiologia veterinária**. 1. ed. Canoas: Editora da ULBRA, 1994. p. 69-71.

PARK, C.; JEONG, J.; KANG, I.; CHOI, K.; PARK, S.; CHAE, C. Increased fucosyl glycoconjugate by *Mycoplasma hyopneumoniae* enhances adherences of *Pasteurella multocida* type A in the ciliated epithelial cells of the respiratory tract. **Veterinary Research**, v. 12, n. 25, p. 1-6, 2016.

PIJOAN, C. Pneumonic Pasteurellosis. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds.). **Disease of Swine**. 9. ed. Ames: State University Press, 2006. p. 719-726.

PORTIS, E.; LINDERMAN, C.; JOHANSEN, L.; STOLTMANN, G. Antimicrobial susceptibility of porcine *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* from the United States and Canada, 2001 to 2010. **Journal of Swine Health and Production**, v. 21, p. 30-41, 2013.

PRESCOTT, J. F. Beta-lactam antibiotics: penam penicillins. In: GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. (Eds.). **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 5. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2013. p. 135-138.

REGISTER, K. B.; BROCKMEIER, S. L.; JONG, C. Pasteurellosis. In: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. (Eds.). **Diseases of Swine**. 10. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2012. p. 798-810.

RIMLER, R. B. Coagglutination test for identification of *Pasteurella multocida* associated with hemorrhagic septicemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.8, p. 214-218, 1978.

ROBERTS, M. C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, p. 1-24, 1996.

ROSNER, H.; GRIMMECKE, H. D.; KNIREL, Y. A.; SHASHKOV, A. S. Hyaluronic acid and a (1-4) beta-D-xylan, extracellular polysaccharides of *Pasteurella multocida* (Carter type A) strain 880. **Carbohydrate Research**, v. 223, p. 329-333, 1992.

RUBIN, J. E. Antimicrobial susceptibility testing methods and interpretation of results. In: GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. (Eds.). **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 5. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2013. p. 11-20.

SANDERS, C. C. Mechanisms responsible for cross-resistance and dichotomous resistance among the quinolones. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 1-8, 2001.

SHIN, S. J.; KANG, S. G.; NABIN, R.; KANG, M. L.; YOO, H. S. Evaluation of the antimicrobial activity of florfenicol against bacteria isolated from bovine and porcine respiratory disease. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 73-77, 2005.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Veterinary Research**, v. 32, p. 201-225, 2001.

SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 519-542, 2004.

SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; WALSH, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 431-437, 2001.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIKEREN, E.; JOHNSON, A.P.; GAASTRA, W. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Veterinary Microbiology**, v. 141, p. 1-4, 2010.

SELLYEI, B.; VARGA, Z.; SZENTESI-SAMU, K.; KASZANYITZKY, E.; MAGYAR, T. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from swine and poultry. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 57, n. 3, p. 357-367, 2009.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. Seção 11 Agentes antimicrobianos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (Eds.). **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2006. p. 433-515.

STEPAN, A. L.; BARCELLOS, D. E. S. N.; BOROWSKI, S. M. Sensibilidade a antimicrobianos de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de casos de pleurite em suínos. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 4, n. 1, p. 19-22, 1998.

STEPAN, A. L. **Tipificação e sensibilidade de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas a partir de lesões de pleurite em suínos terminados**. 1995. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

TAKEUTI, K. L.; NEGRÃO, W. T. T; AMARAL, L. C.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D. E. S. N. Caracterização histopatológica e imuno-histoquímica da pneumonia causada pela co-infecção por *Pasteurella multocida* e *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. 1, p. 1-6, 2013.

TAYLOR, J. D. The Lungs. In: SIMS, L. D.; GLASTONBURY, J. R. W. (Eds.). **Pathology of the Pig. A Diagnostic Guide**. Australia: The Pig Research and Development Corporation and Agriculture Victoria, 1996. p. 234.

TONEVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control**, v. 34, p. 3-10, 2006.

TOWNSEND, K. M.; BOYCE, J. D.; CHUNG, J. Y.; FROST, A. J.; ADLER, B. Genetic organization of *Pasteurella multocida cap* loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 924-929, 2001.

TRUSCOTT, W. M.; HIRSH, D. C. Demonstration of an outer membrane protein with antiphagocytic activity from *Pasteurella multocida* of avian origin. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 6, p. 1538-1544, 1988.

YOSHIMURA, H.; ISHIMARU, M.; ENDOH, Y. S.; KOJIMA, A. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 48, p. 555-560, 2001.

WILKIE, I. W.; HARPER, M.; BOYCE, J. D.; ADLER, B. *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 361, p. 1-22, 2012.

ZHAO, G.; PIJOAN, C.; MURTAUGH, M. P. Epidemiology of *Pasteurella multocida* in a farrow-to-finish swine herd. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 2, p. 136-138, 1993.

3 ARTIGO I

**Antimicrobial susceptibility profile of historical and recent Brazilian pig isolates of
*Pasteurella multocida***

ABSTRACT

Pasteurella (P.) multocida is the causative agent of pneumonic pasteurellosis in swine, which is commonly associated with final stage of enzootic pneumonia or porcine respiratory disease complex. This syndrome is one of the most common and costly diseases of pigs, since it has a negative impact on weight gain and feed conversion. However, data on antimicrobial susceptibility of *P. multocida* isolates are scant in Brazil. Therefore, the present study was carried out to determine and to compare antimicrobial susceptibility profile of Brazilian *P. multocida* isolated from pigs with lesions of pneumonia or pleuritis during two time periods. Historical isolates (period of 1981 to 1997; n=44) and recent isolates (period of 2011 to 2012; n=50) were used to assess the MIC of four antimicrobial agents by microbroth dilution following the CLSI recommendations. Florfenicol had the lowest level of resistance for both historical and recent isolates (0% and 6%, respectively), while tetracycline had the highest (20.5% and 34%, respectively). Resistance increased in recent isolates for all antimicrobial tested, most likely due to the selective pressure of antimicrobial usage to treat and prevent *P. multocida* infections. Regarding to susceptibility profiles, historical and recent *P. multocida* isolates were statistically different ($p < 0.05$) only for amoxicillin and enrofloxacin, which had an increase in the resistance of 3.8% and 18% in recent isolates, respectively.

Key-words: swine, minimum inhibitory concentration (MIC); microbroth dilution; resistance.

3.1 INTRODUCTION

Pasteurella (P.) multocida is the causative agent of pneumonic pasteurellosis in swine. It is commonly associated with final stage of enzootic pneumonia or porcine respiratory disease complex (REGISTER et al., 2012), which is one of the most frequent and costly disease of pigs, since it has a negative impact on weight gain and feed conversion (NOYES, 1990; PIJOAN, 2006).

Antimicrobials are still the first choice for prevention and control of *P. multocida* infections in swine. However, the use of antimicrobial agents can lead to increase of resistance (SCHWARZ et al., 2001). Monitoring antimicrobial susceptibility from *P. multocida* isolated from pigs over time provides valuable information about changes, which may be occurring in susceptibility patterns and is an important tool in effective antimicrobial therapy (SCHWARZ & DANCLA, 2001). Besides that, these data can serve as a decision guidance to choose the drug therapy and may help to recognize the emergence of new resistance phenotypes.

In Brazil, amoxicillin, enrofloxacin, florfenicol and tetracycline are commonly used in swine herds to prevent or to treat respiratory diseases, but data on antimicrobial susceptibility of *P. multocida* isolates are scant (STEPAN, 1998; BOROWSKI et al., 2002; HERES, 2009; MORES et al., 2015). Moreover, to the best of our knowledge, there is no information on antimicrobial resistance profiles over time and only one study (MORES et al., 2015) about minimal inhibitory concentration (MIC) of *P. multocida* isolated in Brazil.

Therefore, this study was carried out to determine and to compare antimicrobial susceptibility profiles during two time periods by determining the MIC of selected antimicrobial agents for a panel of *P. multocida* strains isolated from pigs with lesions of pneumonia or pleuritis in Brazil.

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Bacterial isolates

A total of 94 *P. multocida* isolated from pigs were tested. These isolates belonged to two groups: a - **historical isolates**, wich comprised 44 isolates collected from field cases of pneumonia or pleuritis in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, between 1981 and 1997; b - **recent isolates**, wich included 50 isolates collected from field cases of pneumonia or pleuritis and from pneumonic lesions at slaughterhouses in six States of Brazil: Minas Gerais (21 isolates), Rio Grande do Sul (14 isolates), São Paulo (6 isolates), Santa Catarina (4 isolates), Mato Grosso (4 isolates) and Paraná (1 isolate) between 2011 and 2012.

Historical isolates were preserved lyophilized and stored at 4 - 8°C, while recent isolates were preserved and stored in brain heart infusion (BHI) broth (Oxoid®, Cambridge, UK) containing 50% sheep blood at -70°C.

Reactivation and preliminary tests for the confirmation of pure cultures of *P. multocida* were performed according to Markey et al. (2013) and Townsend et al. (2001).

3.2.2 Minimum inhibitory concentration testing

MIC testing was performed by microbroth dilution method in accordance with criteria provided in the Clinical Laboratory Standards documents VET01-A4 (CLSI, 2013a) and VET-S2 (CLSI, 2013b). Isolates were tested against four antimicrobials at the listed dilutions: amoxicillin (0.0625-512µg/mL), enrofloxacin (0.00098-64µg/mL), florfenicol (0.125-32µg/mL) and tetracycline (0.0625-16µg/mL). *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) was used as reference strain for quality control. However, there is no quality control range of MIC for amoxicillin in the CLSI guidelines.

Prior to MIC testing, bacterial isolates were cultured on blood agar base (Oxoid®) supplemented with 5% sheep blood and incubated for 18-24h at 37°C. Each isolate was suspended in saline to obtain the 0.5 McFarland turbidity. From this suspension, 100µL was added to 9,900µL of Cation-adjusted Mueller-Hinton broth for plate inoculation.

Inoculated plates were incubated for 24h at 35°C. The MIC for each isolate was determined as the lowest concentration of antimicrobial that prevented visible growth. All isolates were tested in triplicate. At least two out of three results had to be the same, if not, MIC testing was repeated.

MICs were summarized and reported as susceptible (S), intermediate (I) and resistant (R) according to CLSI veterinary breakpoints (CLSI, 2013b). This applies for the following antimicrobials (expressed as µg/mL in parentheses): amoxicillin (S≤0.5, I=1, R≥2), enrofloxacin (S≤0.25, I=0.5, R≥1), florfenicol (S≤2, I=4, R≥8) and tetracycline (S≤0.5, I=1, R≥2). As described in CLSI, ampicillin standards were used for interpreting data of amoxicillin.

3.2.3 Statistical analysis

Data were described considering values of MIC maximum, MIC minimum, MIC 50, MIC 90 and susceptibility profiles by groups of strains (historical or recent isolates). A non-parametric analysis was used to compare MIC values and susceptibility profiles between groups of strains and differences were determined using Fisher's exact test (SAS, Version 9.4, 2012). Results were considered statistically significant if $p \leq 0.05$.

3.3 RESULTS

The MICs of reference strain in each test run were within the CLSI acceptable quality control ranges. In the present study, MIC range of amoxicillin for *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was 1-4 μ g/mL. The MIC distribution, MIC range, MIC 50, MIC 90 and antimicrobial resistance profile of four antimicrobial for 94 isolates of *P. multocida* are summarized in Tables 1, 2 and 3.

Recent isolates had higher MIC ranges than historical isolates for all antimicrobial tested. MIC 90 was also higher in recent isolates, except for tetracycline, that presented the same MIC 90 (4 μ g/mL). Florfenicol had the lowest level of resistance for both historical and recent isolates (0% and 6%, respectively), while tetracycline had the highest (20.5% and 34%, respectively).

Susceptibility profiles of historical and recent *P. multocida* isolates were significantly different ($p < 0.05$) only for amoxicillin and enrofloxacin, which had an increase in the resistance of 3.8% and 18% in recent isolates, respectively.

Table 1 - Percentage distribution (%) according to the MIC (minimum inhibitory concentration) of four antimicrobials for 44 historical (H) and 50 recent (R) *Pasteurella multocida* isolates.

MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Frequency (%) of isolates							
	AXC		ENR		FFC		TET	
	H	R	H	R	H	R	H	R
0.00098	-	-	2.3	2	-	-	-	-
0.00195	-	-	18.2	6	-	-	-	-
0.00391	-	-	52.3	10	-	-	-	-
0.00781	-	-	13.6	16	-	-	-	-
0.01562	-	-	9.1	6	-	-	-	-
0.03125	-	-	2.3	8	-	-	-	-
0.06250	0	10	2.3	10	-	-	6.8	2
0.125	4.5	26	0	6	0	2	25	18
0.25	6.8	14	0	2	9.1	8	25	14
0.5	20.5	10	0	16	81.8	68	20.5	22
1	47.7	18	0	16	6.8	12	2.3	10
2	11.4	4	0	0	2.3	4	6.8	14
4	9.1	14	0	0	0	0	13.6	16
8	0	0	0	0	0	0	0	2
16	0	0	0	0	0	4	0	2
32	0	0	0	0	0	2	-	-
64	0	0	0	2	-	-	-	-
128	0	0	-	-	-	-	-	-
256	0	0	-	-	-	-	-	-
512	0	2	-	-	-	-	-	-
>512	0	2	-	-	-	-	-	-
*P	0.0006		<0.0001		0.6696		0.4079	

AXC: amoxicillin; ENR: enrofloxacin; FFC: florfenicol; TET: tetracycline.

*P: Fisher's exact test descriptive level. Differences were considered statistically significant when $P \leq 0.05$.

-: not tested at this antimicrobial concentration.

Table 2 - MIC (minimum inhibitory concentration) range, MIC 50 and MIC 90 of four antimicrobials for 44 historical (H) and 50 recent (R) *Pasteurella multocida* isolates.

	MIC ($\mu\text{g/mL}$) of isolates							
	AMX		ENR		FFC		TET	
	H	R	H	R	H	R	H	R
MIC minimum	0.125	0.0625	0.00098	0.00098	0.25	0.125	0.0625	0.0625
MIC maximum	4	>512	0.06250	64	2	32	4	16
MIC 50	1	0.25	0.00391	0.0625	0.5	0.5	0.25	0.5
MIC 90	2	4	0.01562	1	0.5	1	4	4

AMX: amoxicillin; ENR: enrofloxacin; FFC: florfenicol; TET: tetracycline.

MIC 50, MIC 90: lowest concentration of antimicrobial agent capable of inhibiting the growth of 50% and 90% of isolates, respectively.

Table 3 - Antimicrobial susceptibility profile of four antimicrobials for 44 historical (H) and 50 recent (R) *Pasteurella multocida* isolates based on CLSI standards (CLSI, 2013b).

Susceptibility profile	Frequency (%) of isolates							
	AMX		ENR		FFC		TET	
	H	R	H	R	H	R	H	R
Resistant	18.2	22	0	18	0	6	20.5	34
Intermediate	47.7	18	0	16	0	0	2.3	10
Susceptible	34.1	60	100	66	100	94	77.3	56
*P	0.0080		<0.0001		0.2450		0.0735	

AMX: amoxicillin; ENR: enrofloxacin; FFC: florfenicol; TET: tetracycline.

*P: Fisher's exact test descriptive level. Differences were considered statistically significant when $P \leq 0.05$.

3.4 DISCUSSION

Amoxicillin has been used in Brazil since 1995 and is the most commonly antimicrobial used via feed or water as a herd medication for prophylaxis of pulmonary swine pasteurellosis. Since the exposure of a bacteria to antimicrobial agents can lead to

increase of resistance (BYWATER, 2004), the frequent use of amoxicillin may reflect on the antimicrobial susceptibility profile of *P. multocida*, as it was observed an increase in level of resistance (18.2% historical vs. 22% recent isolates) and MIC90 (2 µg/mL historical vs. 4µg/mL recent isolates). This result is consistent with the findings of another study that investigated the susceptible level of *P. multocida* isolates from pigs in the main swine production areas in Brazil. In that study, Mores et al. (2015) found the resistance level to amoxicillin to be 20%. On the contrary, Jong et al (2014) observed a much lower level of resistance and MIC90 (1.3% and 0.25µg/mL, respectively) in isolates collected in 11 European countries during 2002-2006 comparing with our recent isolates.

Enrofloxacin is the second oldest antimicrobial used in Brazil, introduced in 1988 and widely used to treat pulmonary pasteurellosis. Once more, the selective pressure of antimicrobial usage may explain the increase in level of resistance (0% historical vs. 18% recent isolates) and MIC90 (0.01562 vs. 1 µg/mL) observed in the present study. Different from our study, Nedbalcová & Kucerová (2013) found lower level of resistance and MIC90 of enrofloxacin (1.5%; ≤0.12 µg/mL, respectively) in the Czech Republic. The same author performed a further study (NEDBALCOVÁ et al, 2014) to observe the relationship between antimicrobial resistance and its sales. It was observed a logical link among consumptions and resistance patterns. Nevertheless, overall national sales data have limitations as they do not express real exposure of the animals to antimicrobials.

Florfenicol was introduced in Brazilian pig industry in 1999. In this study, this drug had the lowest level of resistance for both historical and recent isolates (0% and 6%, respectively) and a low MIC90 (0.5µg/mL and 1 µg/mL, respectively). This may indicate a high efficiency of the drug and/or a difficulty to develop resistance to it. Similar results were found elsewhere, such as a much larger study conducted in North America (United States and Canada) with 2.389 *P. multocida* isolates collected during 2001-2010 (PORTIS et al., 2013) in which the level of florfenicol resistance was smaller than 1%, while the MIC90 was 0.5µg/mL. Another study in Korea also showed a high activity of florfenicol (SHIN et al., 2005). In that study, all isolates were susceptible and had a MIC ranging from 0.25 to 0.5µg/mL and MIC90≤0.5µg/mL. According to the authors, despite florfenicol has

been licensed in Korea for treatment of porcine respiratory infections in 1999, it has not been previously used.

Despite tetracycline therapeutics had a long story of use in Brazil (since 1960), its use has decreased at least since the 90's because of high levels of resistance observed in Brazilian pig isolates of *Pasteurella multocida* (STEPAN, 1998). More recently the use has been influenced by the need to comply with export requirements of some of Brazilian pork importers requiring the ban of its use. Furthermore, since tetracycline resistance is extremely widespread (KARRIKER et al., 2012) and its genes can be located in plasmid (KEHRENBERG et al., 2001), resistant strains may still be present in the *P. multocida* population. This could explain the fact that no significant difference ($p>0.05$) was found in susceptibility profiles between strains isolated in different periods, with MIC90 of 4µg/mL in both historical and recent isolates. In Australia, a similar level of resistance and MIC90 (28%; 2µg/mL, respectively) against tetracycline were reported in isolates collected between 2002-2013 (DAYAO et al., 2014).

Since the creation of a new class of antimicrobial agent is very expensive and takes a lot of time, every effort must be undertaken to retain the efficacy of those substances currently available for veterinary use (BOERLIN, 2013). Furthermore, it is not possible to stop resistance development, but it is possible to slow down the selection and spread of resistance (SCHWARZ & DANCLA, 2001). This underlines the importance of responsible use of antimicrobials when treating *P. multocida* infections and the need to create a national monitoring program as in other countries like Germany (GERM-Vet), France (Résapath), Czech Republic (Control of Veterinary Biologicals and Medicaments - ISCVBM) and Europe (VetPath) to investigate quantitatively in vitro susceptibility and assist veterinarian in the selection of the most suitable antibiotic and its correct dose.

3.5 CONCLUSIONS

The study found that, based on the MIC breakpoints obtained, there was a numerical increase of resistance in recent isolates for all antimicrobial tested, indicating an increase of resistance over time, most likely caused by the selective pressure of antimicrobial usage to

treat and prevent *P. multocida* infections in pig farms. Regarding to susceptibility profiles, historical and recent *P. multocida* isolates were statistically different only against amoxicillin and enrofloxacin ($p < 0.05$).

REFERÊNCIAS

BOERLIN, P.; WHITE, D. G. Antimicrobial resistance and its epidemiology. In: GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. (Eds.). **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 5. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2013. p. 21-40.

BOROWSKI, S. M.; BARCELLOS, D. E. S. N.; RAZIA, L. E.; COUTINHO, T. A. Padrão de resistência antimicrobiana de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas em pulmões de suínos. **Revista da FZVA Uruguiana**, v. 9, n. 1, p. 104-110, 2002.

BYWATER, R. J. Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 51, p. 361-363, 2004.

CLSI. *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals*; Approved Standard - Fourth Edition. **CLSI document VET01-A4**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013a.

CLSI. *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals*; Second informational supplement. **CLSI document VET01-S2**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013b.

DAYAO, D. A. E.; GIBSON, J. S.; BLACKALL, P. J.; TURNI, C. Antimicrobial resistance in bacteria associated with porcine respiratory disease in Australia. **Veterinary Microbiology**, v. 171, p. 232-235, 2014.

HERES, T. S. **Caracterização de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de lesões pneumônicas associadas ou não com circovirose em suínos**. 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

JONG, A.; THOMAS, V.; SIMJEE, S.; MOYAERT, H.; GARCH, F.; MAHER, K.; MORRISSEY, I.; BUTTY, P.; KLEIN, U.; MARION, H.; RIGAUT, D.; VALLÉ, M. Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: The VetPath study. **Veterinary Microbiology**, v. 172, p. 202-215, 2014.

KARRIKER, L. A.; COETZEE, J.; FRIENDSHIP, R. M.; PRESCOTT, J. F. Drug pharmacology, therapy, and prophylaxis. In: Zimmerman J. J., Karriker L. A., Ramirez A., Schwartz K. J.; Stevenson G. W. (Eds.). **Diseases of Swine**. 10. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2012. p. 106-118.

KEHRENBERG, C.; SALMON, S. A.; WATTS, J. L.; SCHWARZ, S. Tetracycline resistance genes in isolates of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosidal* and *Mannheimia varigena* from bovine and swine respiratory disease: intergeneric spread of the *tet*(H) plasmid pMHT1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 631-640, 2001.

MARKEY, B.; LEONARD, F.; ARCHAMBAULT, M.; CULLINANE, A.; MAGUIRE, D. *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Bibersteinia* and *Avibacterium* species. In: MARKEY B., LEONARD F., ARCHAMBAULT M., CULLINANE A.; MAGUIRE D. (Eds.). **Clinical Veterinary Microbiology**. 2. ed. Toronto: Elsevier, 2013. p. 307-316.

MORES, M. A. Z.; OLIVEIRA FILHO, J. X.; REBELATTO, R.; KLEIN, C.; BARCELLOS, D. E. N.; COLDEBELLA, A.; MORES, N. Aspectos patológicos e microbiológicos das doenças respiratórias em suínos de terminação no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 725-733, 2015.

NEDBALCOVÁ, K.; KUČEROVÁ, Z. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* isolates associated with porcine pneumonia. **Acta Veterinaria Brno**, v. 82, p. 003-007, 2013.

NEDBALCOVÁ, K.; NECHVATALOVA, K.; POKLUDOVA, L.; BURES, J.; KUCEROVA, Z.; KOUTECKA, L.; HERA, A. Resistance to selected beta-lactam antibiotics. **Veterinary Microbiology**, v. 171, p. 328-336, 2014.

NOYES, E.; FEENEY, D.; PIJOAN, C. Comparison of the effect of pneumonia detected during a lifetime with pneumonia detected at slaughter on growth in swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, p. 1025-1029, 1990.

PIJOAN, C. Pneumonic Pasteurellosis. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds.). **Disease of Swine**. 9. ed. Ames: State University Press, 2006. p. 719-726.

PORTIS, E.; LINDERMAN, C.; JOHANSEN, L.; STOLTMANN, G. Antimicrobial susceptibility of porcine *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* from the United States and Canada, 2001 to 2010. **Journal of Swine Health and Production**, v. 21, p. 30-41, 2013.

REGISTER, K. B.; BROCKMEIER, S. L.; JONG, C. Pasteurellosis. IN: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. (Eds.). **Diseases of Swine**. 10. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2012. p. 798-810.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Veterinary Research**, v. 32, p. 201-225, 2001.

SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; WALSH, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 431-437, 2001.

SHIN, S. J.; KANG, S. G.; NABIN, R.; KANG, M. L.; YOO, H. S. Evaluation of the antimicrobial activity of florfenicol against bacteria isolated from bovine and porcine respiratory disease. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 73-77, 2005.

STEPAN, A. L.; BARCELLOS, D. .E. S. N.; BOROWSKI, S. M. Sensibilidade a antimicrobianos de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de casos de pleurite em suínos. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 4, n. 1, p. 19-22, 1998.

TOWNSEND, K. M.; BOYCE, J. D.; CHUNG, J. Y.; FROST, A. J.; ADLER, B. Genetic organization of *Pasteurella multocida cap* loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 924-929, 2001.

4 ARTIGO II

Comparison of phenotypic and genotypic identification methods of *Pasteurella multocida* serotypes isolated from pigs

O presente artigo foi submetido à revisão de Inglês na empresa **Sci-Edit Publications** e sua formatação segue as normas da revista a qual será submetido.

**Comparison of Phenotypic and Genotypic Identification Methods of
Pasteurella multocida Serotypes Isolated from Pigs**

**Comparação de Métodos Fenotípicos e Genotípico de Identificação de Isolados de
Pasteurella multocida de Suínos**

Amanda Figueiredo Amaral¹, Raquel Rebelatto², Catia Silene Klein², Karine
Ludwig Takeuti¹ & David Emilio Santos Neves de Barcellos¹

¹Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. CORRESPONDENCE: A.F. Amaral [amandamaralvet@hotmail.com - Tel.: +55 (51) 8239-1856]. Avenida Bento Gonçalves, 9090, Agronomia. 91540-000 Porto Alegre, RS, Brasil.

²EMBRAPA Suínos e Aves, Concórdia, SC.

ABSTRACT

Background: *Pasteurella multocida* serotypes A and D are commonly associated with pneumonia and pleuritis in pigs. Different phenotypic techniques, such as hyaluronidase and acriflavine tests, and genotyping techniques, such as PCR, are used to distinguish between these serotypes. The objective of this study was to compare the capsular identification methods of type A and type D *P. multocida* isolated from pigs using both phenotypic (hyaluronidase and acriflavine tests) and genotypic (multiplex PCR) techniques. **Materials, Methods & Results:** A total of 44 lyophilized *P. multocida* isolates, obtained between 1981 and 1997 from pig farms at Rio Grande do Sul State, Brazil, were analyzed. The isolates were reactivated in brain heart infusion (BHI) broth and cultured in BHI broth and blood agar supplemented with 5% sheep blood. Colony identity was further confirmed by evaluating colony morphology in blood agar and confirming the absence of growth on MacConkey agar. Bacteria in TSA were used for the triple sugar iron (TSI), sulfide-indole-motility (SIM), and nitrate, glucose, lactose, sucrose and mannitol fermentation tests. For hyaluronidase test, *P. multocida* colonies were streaked transversally across the entire plate, approximately 3-5mm apart, in order to observe their lines of growth. Following this, a hyaluronidase producing strain of *Staphylococcus aureus* was heavily streaked at right

angles to the *P. multocida* lines and the plates were incubated at 37°C for 24h. Type A isolates were then identified as those with smaller colonies in the region adjacent to the *Staphylococcus aureus* streak (negative satellitism). For acriflavine test, the isolates were inoculated into tubes containing 2 mL of BHI, incubated at 37°C for 18-24 h, centrifuged (1,500 rpm for 15 min) and 1.5 mL of the supernatant was discarded. A 1:1000 solution of acriflavine neutral (0.5mL) was then added to the residual broth containing bacteria and kept at room temperature. Solutions of acriflavine were freshly prepared each week and stored protected from light. Type D strains were identified by the appearance of a heavy flocculent precipitate within 5 minutes. DNA extraction by heat shock was performed prior to multiplex PCR for the detection of capsular genes *hyaD-hyaC* (capsular typing A) and *dcbF* (capsular typing D). Test of symmetry and a weighted kappa coefficient were used to evaluate correlations and to assess agreement of the results between the identification methods, respectively. Phenotypic tests showed that two isolates were type D (4.55%), 40 were type A (90.9%) and two (4.55%) were untypable isolates (4.55%) while PCR showed that 38 isolates were type A (86.36%) and six were type D (13.64%). The correlation analysis between the phenotypic and genotypic tests showed that 90.9% of the strains were identified as belonging to the same serotype by both tests and the weighted kappa coefficient ($K = 0.633$) indicates a substantial agreement between the two tests.

Discussion: There was a disagreement between the phenotypic and genotypic results in four of the isolates (9.09%). The phenotypically untypable isolates were classified as type D by multiplex PCR. Nonetheless, we conclude that PCR testing is a more reliable method to differentiate between *P. multocida* serotypes A and D.

Keywords: swine, hyaluronidase, acriflavine, PCR.

Descritores: suínos, hialuronidase, acriflavina, PCR.

4.1 INTRODUCTION

Pasteurella multocida is a bacteria found worldwide and is associated with pneumonia and pleuritis in pigs [13]. This microorganism is a member of the

Pasteurellaceae family considered nutritionally fastidious, growing better in media supplemented with serum or blood, and it does not grow on MacConkey agar [10]. These bacteria can be classified based on its capsule into five serotypes as types A, B, D, E and F [3]. Serotypes A and D are most commonly associated with pneumonia, rhinitis and pleuritis in pigs, but serotype D is more commonly associated with atrophic rhinitis [13] and serotype A with pneumonia and pleuritis [2,11,12].

A test was developed to identify type A strains after they observed a depolarization of the *P. multocida* capsule when growing close to a hyaluronidase producing strain of *Staphylococcus aureus* (negative satellitism) [4]. Another technique was developed to recognize type D strains based on a floccular reaction of this strain to acriflavine [5]. However, such phenotypic tests have been replaced by PCR-based capsular genotyping techniques [14] which are the current gold standard [6]. Thus, the objective of this study was to compare phenotypic (hyaluronidase and acriflavine tests) and genotypic (multiplex PCR) techniques for the capsular typing of *P. multocida* isolates (type A and type D).

4.2 MATERIAL AND METHODS

4.2.1 *Pasteurella multocida* isolates

A total of 44 *P. multocida* isolates obtained from field cases of pleuritis or pneumonia in pigs in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, were used in this study. All samples were isolated between 1981 and 1997, lyophilized, and stored at 4-8°C.

The isolates were reactivated in brain heart infusion (BHI) broth¹, and cultured in BHI broth and a blood agar base¹ supplemented with 5% sheep blood. After incubation for 24-48h, a single colony of *P. multocida* was plated on to blood agar and then on to tryptone soy agar (TSA) and MacConkey agar¹. Colony identity was further confirmed by evaluating colony morphology in blood agar and confirming the absence of growth on MacConkey agar. Bacteria in TSA were used for the triple sugar iron (TSI), sulfide-indole-motility (SIM), and nitrate, glucose, lactose, sucrose and mannitol² fermentation tests [10]. Subsequently, pure isolates of *P. multocida* were stored in BHI broth containing 50% sheep blood at -70°C.

4.2.2 Phenotype testing

The isolates were phenotypically classified into two groups, types A or D, based on capsular type, using the hyaluronidase and acriflavine tests.

The hyaluronidase test was performed to classify the isolates in type A [4]. Briefly, *P. multocida* colonies were streaked transversally across the entire plate, approximately 3-5mm apart, in order to observe their lines of growth. Following this, a hyaluronidase producing strain of *Staphylococcus aureus* was heavily streaked at right angles to the *P. multocida* lines and the plates were incubated at 37°C for 18-24h. Type A isolates were then identified as those with smaller colonies in the region adjacent to the *Staphylococcus aureus* streak (negative satellitism). The acriflavine test was performed for identifying type D isolates [5]. The isolates were inoculated into tubes containing 2 mL of BHI, incubated at 37°C for 18-24 h, centrifuged (1.500 rpm for 15 min) and 1.5 mL of the supernatant was discarded. A 1:1000 solution of acriflavine neutral (0.5mL)² was then added to the residual broth containing bacteria and kept at room temperature. Solutions of acriflavine were freshly prepared each week and stored protected from light. Type D strains were identified by the appearance of a heavy flocculent precipitate within 5 min.

4.2.3 Multiplex PCR

DNA extraction by heat shock was performed prior to multiplex PCR for the detection of capsular genes *hyaD-hyaC* (capsular typing A) and *dcbF* (capsular typing D) [14]. The *kmt1* gene was used for positive identification of the species as it is specific for *P. multocida*. The sequence of each primer pair and the expected size of each amplicon are described in Table 1.

Table 1. Capsule genes selected, primer sequence and amplicon size.

Gene	Primer sequence (5'-3')	Primer	Amplicon (pb)
<i>hyaD-hyaC</i>	TGC CAA AAT CGC AGT CAG	CapA F	1.044
	TTG CCA TCA TTG TCA GTG	CapA R	
<i>dcbF</i>	TTA CAA AAG AAA GAC TAG GAG CCC	CapD F	657
	CAT CTA CCC ACT CAA CCA TAT CAG	CapD R	
<i>kmt1</i>	ATC CGC TAT TTA CCC AGT GG	KMT1 T7	460
	GCT GTA AAC GAA CTC GCC AC	KMT1 SP6	

Townsend et al. (2001).

Briefly, the PCR mix consisted of 2.5 μ L of 10X PCR buffer; 5 μ L of 1 mM deoxynucleoside triphosphates; 1 μ L of CapA primer³ pair at 10pmol; 0.5 μ L of CapD⁴ and KMT1 primer⁵ pairs at 10pmol; 0.2 μ L of Taq DNA polymerase⁶; 1.05 μ L of 50 mM MgCl₂; 4 μ L of DNA and sterile ultrapure water for a final volume of 25 μ L. Amplification was performed in a thermal cycler⁷ under the following reaction conditions: initial denaturation (95°C for 5 min) followed by 30 cycles of denaturation (95°C for 30 seconds), annealing (55°C for 30 seconds), elongation (72°C for 30 seconds) and a final elongation stage (72°C for 5 min). Electrophoresis of the amplified products was carried out in a 1.5% agarose gel⁸ stained with ethidium bromide, and the amplified products were visualized in an ultraviolet light transilluminator⁹. *P. multocida* serotypes A and D were used as a positive control, while sterile ultrapure water was used as a negative control.

4.2.4 Statistical analysis

Correlations were evaluated using the test of symmetry and a weighted kappa coefficient was used to determine symmetry and assess agreement of the results. For all statistical analysis, a *p*-value <0.05 was considered statistically significant (SAS, Version 9.4, 2012).

4.3 RESULTS

The phenotypic tests identified two isolates as type D (4.55%) and 40 isolates as type A (90.9%). Two isolates (4.55%) were positive for both the hyaluronidase and acriflavine tests and were, thus, regarded as untypable (Table 2).

Table 2. Correlation of capsular typing results between phenotypic (hyaluronidase and acriflavine) and genotypic (multiplex PCR) tests.

Genotypic	Phenotypic			Total
	A	D	U*	
A	38	0	0	38
D	2	2	2	6
U*	0	0	0	0
Total	40	2	2	44

Percentage agreement: 90.9%

Kappa coefficient: 0.633 (0.404-0.862)

*Untypable

Contrarily, the multiplex PCR was able to detect all genes of interest (Table 1) and definitively classify the isolates as either type A or type D. A total of 38 isolates were identified as type A (86.36%), while six were identified as type D (13.64%) (Table 2). The results of the phenotypic tests did not coincide with those of the multiplex PCR in four of the 44 isolates (9.09%) tested, and the test of symmetry did not show a significant difference between the identification results from both tests ($p = 0.2615$).

4.4 DISCUSSION

Phenotypic tests could not conclusively identify 4 of the isolates tested even though the PCR identified them as being type D, and others have reported similar results. Another study has reported that 55 of 114 (48.24%) *P. multocida* strains obtained from different

animal hosts, including pigs, were untypable using only the hyaluronidase and acriflavine tests [1]. However, in that study, unlike our study, the strains classified as untypable were negative for both the hyaluronidase and acriflavine tests. Similarly, it was found that 11 of 54 (20.37%) strains isolated during a fowl cholera outbreak in Brazil were untypable using these phenotypic tests [7].

The phenotypically untypable isolates were classified as type D by multiplex PCR. This can be explained by the fact that some type D strains show a slight reduction in colony size when grown near a *Staphylococcus aureus* streak, which indicates that these strains may possess a small amount of peripheral hyaluronic acid [4]. Phenotypic tests results can also change in some *P. multocida* isolates when they produce capsules with different properties as part of the colony ageing process or even as a response to changes in the composition of the medium [8].

A correlation analysis between the phenotypic and genotypic tests showed that 90.9% of the strains were identified as belonging to the same serotype by both tests (Table 2), and the weighted kappa coefficient ($K = 0.633$) indicates a substantial agreement between the two tests [9]. Nonetheless, since the multiplex PCR is based on the presence of the capsule gene and not the capsule itself, the PCR was able to definitively identify the isolates.

4.5 CONCLUSION

The results of this study showed that little discrepancies between phenotypic and genotypic testing methods can occur. It was concluded that the PCR method is more efficient compared to the phenotypic methods for clearly distinguishing between *P. multocida* serotypes A and D.

MANUFACTURERS

¹Oxoid®. Cambridge, UK.

²Sigma®. Saint Louis, USA.

³IDT. San Diego, USA.

⁴IDT.San Diego, USA.

⁵Bioneer. Alameda, USA.

⁶Invitrogen. Carlsbad, USA.

⁷Eppendorf. Hamburgo, Germany.

⁸Easy Path. Lacedemônia, Brazil.

⁹Loccus Biotecnologia. Cotia, Brazil.

Acknowledgments. The authors thank Capes for financial support and Dr. Arlei Coldebella (Embrapa Suínos e Aves) for help in statistical analysis.

REFERENCES

1 Arumugam N.D., Ajam N., Blackall P.J., Asiah N.M., Maria J., Yuslan S. & Thong K.L. 2011. Capsular serotyping of *Pasteurella multocida* from various animal hosts - a comparison of phenotypic and genotypic methods. *Tropical Biomedicine*. 28(1): 55-63.

2 Borowski S.M. 2001. Caracterização e estudo de virulência de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos no estado do RS, Brasil. 163p. Porto Alegre, RS. Thesis (PhD in Veterinary Medicine) - Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3 Carter G.R. 1955. Studies on *Pasteurella multocida* I. A haemoagglutination test for the identification of serological types. *American Journal of Veterinary Research*. 16: 481-484.

4 Carter G.R. & Rundell D.W. 1975. Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase. *The Veterinary Record*. 87: 343.

5 Carter G.R. & Subronto P. 1973. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. *American Journal of Veterinary Research*. 34(2): 293-294.

6 Dziva F., Muhairwa A.P., Bisgaard M. & Christensen H. 2008. Diagnostic and typing options for investigation diseases associated *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*. 128: 1-22.

7 Furian T.Q., Borges K.A., Pilatti R.M., Almeida C., Nascimento V.P. Do, Salle C.T.P. & Moraes H.L. de S. 2014. Identification of the capsule type of *Pasteurella multocida* isolates from cases of fowl cholera by multiplex PCR and comparison with phenotypic methods. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 16(2): 31-36.

8 Glisson J.R. 2008. Pasteurellosis and other respiratory bacterial infection. In: Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E. (Eds). *Diseases of Poultry*. 12.ed. Iowa: Blackwell Publishing, pp. 739-758.

- 9 Landis J.R. & Koch G.G. 1977.** The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 33: 159-174.
- 10 Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinane A. & Maguire D. 2013.** *Pasteurella, Mannheimia, Bibersteinia* and *Avibacterium* species. In: Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinane A. & Maguire D. (Eds). *Clinical Veterinary Microbiology*. 2.ed. Toronto: Elsevier, pp. 307-316.
- 11 Mores M.A.S. 2006.** Anatomopatologia e bacteriologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaças em suínos. 91p. Curitiba, PR. Dissertation.(M.Sc. in Veterinary Medicine) - Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.
- 12 Pijoan C. 2006.** Pneumonic Pasteurellosis. In: Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S. & Taylor D.J. (Eds). *Disease of Swine*. 9.ed. Ames: State University Press, pp.719-726.
- 13 Register K.B., Brockmeier S.L., De Jong M.F. & Pijoan C. 2012.** Pasteurellosis. In: Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J. & Stevenson G.W. (Eds). *Diseases of Swine*.10.ed.Ames: Wiley-Blackwell, pp.798-810.
- 14 Townsend K.M., Boyce J.D., Chung J.Y., Frost, A.J. & Adler B. 2001.** Genetic organization of *Pasteurella multocida cap* Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(3): 924-929.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O primeiro trabalho apresenta o perfil de suscetibilidade a quatro antimicrobianos de amostras históricas e contemporâneas de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos no Brasil. Esse estudo mostrou que houve um aumento numérico dos isolados resistentes para todos os antimicrobianos testados. Esse aumento se deve, provavelmente, à pressão de seleção pelo uso de antimicrobianos para tratamento e/ou prevenção de infecções por *P. multocida* em granjas de suínos brasileiras. Em relação aos perfis de suscetibilidade, isolados históricos e contemporâneos de *P. multocida* foram estatisticamente diferentes apenas para amoxicilina e enrofloxacina ($p < 0.05$). As informações obtidas nesse trabalho podem contribuir para a escolha e uso adequado de antimicrobianos para o tratamento e/ou prevenção de infecções causadas pela *P. multocida* nas granjas de suínos do Brasil.

O segundo trabalho demonstrou que, uma vez que o resultado da PCR *multiplex* é direto, sem a necessidade de interpretação por parte do executor, essa técnica se torna mais confiável. Além disso, esse teste consumiu menos tempo e reagentes comparado com os testes fenotípicos (hialuronidase e acriflavina).

